

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **61-247396**

(43)Date of publication of application : **04.11.1986**

(51)Int.Cl. **C12P 17/06**

//(C12P 17/06

C12R 1:38)

(21)Application number : **60-088235** (71)Applicant : **YAMANOUCHI
PHARMACEUT CO LTD
OGAWARA HIROSHI**
(22)Date of filing : **24.04.1985** (72)Inventor : **OGAWARA HIROSHI
WATANABE SHUNICHI**

(54) PRODUCTION OF GENISTEINE

(57)Abstract:

PURPOSE: To separate genisteine having inhibitory action on specific tyrosine-specific phosphatase which is a cancer gene product from a culture fluid, by cultivating a microorganism belonging to the genus *Pseudomonas*.

CONSTITUTION: *Pseudomonas* sp. YO-0170J strain (FERM-P No. 8170) belonging to the genus *Pseudomonas* is cultivated in a nutrient culture medium under aerobic conditions. The aimed genisteine is recovered from the culture medium by a commonly used means for recovering the well-known fermentation products. The *Pseudomonas* sp. YO-0170J strain is a Gram-negative absolutely aerobic bacillus having polar multi-trichous flagella without forming spores.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報 (A)

昭61-247396

⑬ Int.Cl.⁴C 12 P 17/06
//(C 12 P 17/06
C 12 R 1:38)

識別記号

厅内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)11月4日

7732-4B

6760-4B 審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 ゲニステインの製造法

⑯ 特願 昭60-88235

⑰ 出願 昭60(1985)4月24日

⑱ 発明者 小河原 宏 東京都文京区湯島2-33-9

⑲ 発明者 渡辺 俊一 大宮市大字蓮沼869-3

⑳ 出願人 山之内製薬株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目5番地1

㉑ 出願人 小河原 宏 東京都文京区湯島2-33-9

㉒ 代理人 弁理士 藤野 清也 外1名

明細書

1. 発明の名称

ゲニステインの製造法

2. 特許請求の範囲

- 1 ゲニステイン(化学名: 5,7,4'-トリヒドロキシイソフラボン)生産能を有するシュードモナス(*Pseudomonas*)属に属する微生物を培養し、培養液よりゲニステインを採取することを特徴とするゲニステインの製造法
- 2 シュードモナス属に属する微生物がシュードモナス エス・ピー YO-0170 J 株(微研菌寄第8170号)である特許請求の範囲第1項記載の製造法

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、発酵法によるゲニステインの製造法に関する。

さらに詳しくは、本発明は、シュードモナス

(*Pseudomonas*)属に属するゲニステイン(化学名: 5,7,4'-トリヒドロキシイソフラボン)生産菌を培地に培養し、培養物よりゲニステインを採取することを特徴とするゲニステインの製造法に関する。

(従来の技術)

ゲニステインは、ジャーナル オブ ザ ケミカル ソサエティー 3447 頁(1951年)に記載されている公知化合物である。同刊行物によればゲニステインは、ある種のクローバー(*Trifolium subterraneum L.*)から単離され、エストロジエン作用を有する物質として報告されている。

(解決手段)

本発明者等は、土壤から分離したシュードモナス エス・ピー YO-0170 J 株(微研菌寄第8170号)を培養し、その培養液から、癌遺伝子産物であるチロシン特異的リン酸化酵素の阻止作用を有する物質を分離した。そしてこの物質がゲニステインであることを確認し、本発明を完成した。

本発明の製造法で使用される YO-0170 J 株の菌学的性状は、以下の通りである。

YO-0170 J 株の菌学的性状

1. 形態的性質

肉汁寒天培地で 2 ~ 3 日培養した細胞は、 $0.6 \sim 0.8 \times 1.2 \sim 1.8 \mu\text{m}$ の桿菌で、1 ~ 2 本の極鞭毛を有し、運動性がある。胞子は形成せず、グラム陰性である。

2. 各種培地での生育状態

① 肉汁寒天培地 (28°C, 2 ~ 7 日)

菌体はうす黄茶色を呈し、増殖はさかんである。

② 肉汁プロス (28°C, 2 ~ 7 日)

培地が全体に濁る。

③ リトマスマルク (37°C, 2 ~ 10 日)

中性～アルカリ性のまま液化される。

④ 肉汁ゼラチン穿刺培養 (28°C, 2 ~ 10 日)

わずかに液化する。

以上の菌学的性質を有する既知菌種をバージェイズ マニュアル オブ デターミネイティブ バクテリオロジイ第8版及びバージェイズ マニュアル オブ システマティック バクテリオロジイ第一巻、及び過去の文献により検索した。

YO-0170 J 株は、グラム陰性桿菌で、胞子を形成せず極毛性の鞭毛を有する絶対好気性の菌である。この様な性質を有する菌属として、シュードモナス属、キサントモナス (*Xanthomonas*) 属、フラトイリア (*Frateuria*) 属、ズーグロア (*Zoogloea*) 属があげられるが、キサントモナス属の菌は特徴的な黄色の色素キサントモナシン (*Xanthomonadin*) を生成するのに對し、本菌株ではその様な特徴はみられない。また、フラトイリア属の菌は、30%グルコース中で生育し、GYC 寒天培地 (グルコース 1%, イーストエキス 0.2%, カザミノ酸 0.2%, リン酸二カリウム 0.05%, 寒天 1.5%, pH 7.3) で特徴的な可溶性色素を生成する点で本菌株と異なる。ズーグリニア属の菌は、菌体

③ 生理的性質

	+	-
オキシダーゼ	-	+
ポリメーハイドロキシブチレートの 菌体内蓄積	+	-
カタラーゼ	+	-
ウレアーゼ反応	士	-
インドールの生成	-	-
硫化水素の生成	-	-
硝酸塩の還元	-	-
クエン酸の利用 (シモンズ培地)	-	-
V P アスト	-	-
M R アスト	-	-
色素の生成	-	-
デンプンの加水分解	-	-
ゼラチンの液化	士	-
リバーゼ (Tween 80 の水解)	-	-
O P アスト	0型	-
脱窒反応	-	++;陽性
生育温度範囲	10 ~ 42°C	士;弱陽性
至適生育温度	35°C	-
嫌気条件下での生育	-	-
栄養要求性	なし	-

{+;陽性
士;弱陽性
(-;陰性)

④ 炭素源の利用性

トレハロース	+	D-ガラクトース	+
フラクトース	+	マルトース	士
グルコース	+	ラクトース	-
L-アラビノース	-	D-ソルビトール	-
D-キシロース	+	ナリシノ	-
ショクロース	+	グリセリン	+
イノシトール	-	デキストリン	+
L-ラムノース	-		
L-タフィノース	士		
マニトール	-		

{+;利用する
士;利用性が疑わしい
(-;利用しない)

外にスライムを形成し、寒天培地中で特徴ある生育を示す (*Zoogloea* の形成) ことで本菌株と明白に異なる。一方、シュードモナス属について記載された諸性質は、本菌株の性質と一致している事より、本菌株はシュードモナス属の一菌種であると判断される。

さらに、シュードモナス属の菌について上記の文献などにより検索すると本菌株は、ポリメーハイドロキシブチレートを菌体内に蓄積せず、又これを炭素源として利用できないことから、シュードモナス属のセクション I に属すると考えられる。これらのグループのうちで、蛍光色素を生成せず、グルコースを唯一の炭素源として生育できる菌としては、シュードモナス シュッツュイ (*Pseudomonas stutzeri*) 及びシュードモナス メンドシナ (*Pseudomonas mendocina*) があげられる。前者は脱窒反応及びデンプンの加水分解能が陽性であるが本菌株ではこれらは陰性である。又、炭素源の利用性も若干異なる。一方後者は、本菌株でみられない黄色の可溶性色素を生産するが、そ

れ以外の性質は、ほぼ一致していることから、本菌株は、シュードモナス メンドシナ にきわめて近縁の種であると判断される。これらの観点に基づき、本菌株をシュードモナス エス・ピー YO-0170 J 株と命名した。

本菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号微工研菌寄第 8170 号として寄託されている。

ゲニステイン生産菌については、土壤分離株のほか自然の突然変異によって得られる突然変異体ならびに上記記載の微生物から、X 線照射、紫外線照射、ニトロソグアニジン処理、ナイトロジンマスター等のような慣用の手段によって得られる。人工突然変異体を得ることによって、ゲニステインの生産を高めることが出来る。

この発明のゲニステインの生産は、例えば、シュードモナス・エス・ピー YO-0170 J 株を、炭素源、および窒素源を含有する栄養培地中、例えば、振とう培養、液体培養、等の好気的培養条件下に培養する事によって行われる。

ような消泡剤を加えてよい。

ゲニステインの生産には好気的液体培養が望ましい。

小量生産の場合にはフラスコ等により振とう培養か表面培養が行われる。さらにまた大型タンク中で培養する場合には、ゲニステインの生産工程での生育遅延を避けるために生産タンクに微生物を成長能力のある形で接種することが好ましい。すなわち、最初に成長力のある微生物を、少量の培地に該微生物の菌体を接種することにより生長させ、これらを培養し、次いで培養した成長力のある微生物を大型タンクに無菌接種する。

培養物の攪拌および通気は種々の方法で行なうことが出来る。攪拌はプロペラまたは、類似の機械的攪拌装置によるか、醸酵フラスコの回転又は振とうによるか、種々のポンプ装置によるか、または培地中を滅菌空気を通過させるこれにより行なうことが出来る。

醸酵は通常、約 20°～40°C の温度範囲、好ま

栄養培地中の好ましい炭素源としては、例えれば、ぶどう糖、澱粉、果糖、グリセリン等のような炭水化物等が挙げられ、その他、乳糖、アラビノース、キシロース、デキストリン、糖蜜等が挙げられる。

好ましい窒素源としては、酵母エキス、ベプトン、グルテンミール、綿実粉、大豆粉、乾燥酵母、小麦胚芽、ふすま、コーンスティーブリカ、ファーマメディア、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、等のアンモニウム塩、尿素、アミノ酸等のような無機および有機窒素化合物が挙げられる。

炭素源および窒素源は組合せて使用するのが有利である。又、必要な場合は、培地に、炭酸カルシウム、リン酸ナトリウム、またはリン酸カリウム、塩化ナトリウム、または塩化カリウム、マグネシウム塩類、銅塩、コバルト塩類等のようなミネラル塩類を添加してもよい。

培地が著しく発泡する場合には、液状パラフィン、脂肪油、植物油、鉱物油、又はシリコンの

しくは 27°C で約 50～150 時間行われる。

ゲニステインは培地から、従来公知の他の醸酵生産物の回収に通常使用される慣用の手段によって回収する事が出来る。

このようにして生産されたゲニステインの大部分は通常、培養液中に見い出されるので、培養液の菌体を渾過または遠心分離で除去して得られる濁液から有機溶剤による抽出、非イオン吸着樹脂等の処理、pH 調整、凍結乾燥、減圧濃縮等の手段を組合せて分離・精製することが出来る。有機溶剤としては酢酸エチル、クロロホルム、メチルイソブチルケトン、ブタノール等が利用され、非イオン吸着樹脂としては、例えば HP-20、活性炭、ケイ酸、シリカゲル、セルロース、アルミナ等の吸着剤処理が用いられる。

このようにして得られるゲニステインは下記の物理化学的性質を有する。

1) 分子量

質量分析(マススペクトル)

M = 270

2) 分子式

 $C_{15}H_{10}O_3$ 3) 紫外部吸収 $263\text{ m}\mu$

4) 核磁気共鳴スペクトル

CD_3OD (δ) : 8.05(1H, s) 7.37(2H, d)
6.84(2H, d) 6.34(1H, d)
6.22(1H, d)

5) 溶解度

メタノール、エタノールに可溶、酢酸エチル、アセトン、クロロホルムに難溶、水、ベンゼン、トルエンに不溶

6) 呈色反応

過マンガン酸カリウム、ヨウ素に対して陽性、ニンヒドリン、ドラゲンドルフ陰性

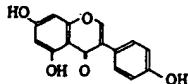
7) 物質の性質

酸性

上記物理化学的性質は、別途化学的に合成された下記化学構造式を有するゲニステインと一致する。

を滅菌水 4.5 mL に注ぎ、10倍希釈とした。この操作を次の試験管から繰り返して100倍希釈液1.000倍希釈液を作り夫々の希釈液の 0.05 mL ~ 0.5 mL をペトリ皿中の $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20分滅菌溶解したアルギニン・ビタミン寒天培地(AV培地)(レーアルギニン 0.3 g , グルコース 1.0 g , グリセロール 1.0 g , リン酸二カリウム 0.3 g , 硫酸マグネシウム 0.3 g , 食塩 0.3 g , 硫酸鉄 1 mg , 塩化マンガン 1 mg , 硫酸亜鉛 1 mg , チアミン塩酸塩 0.5 mg , リボフラビン 0.5 mg , ニコチン酸アミド 0.5 mg , ピリドキシン塩酸塩 0.5 mg , イノシトール 0.5 mg , バントテン酸カルシウム 0.5 mg , バラアミノ安息香酸 0.5 mg , ピオチン 0.25 mg , 寒天 15 g , 蒸留水 1 L , pH 6.4) $10\text{~}20\text{ mL}$ の中に混和し、室温放置し固まらせた。平板を $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ で5~7日間培養し、次いで生育コロニーを釣り上げ、ベネット寒天培地(グルコース 1% , NZ-アミン 0.2% , 牛肉エキス 0.1% , 酵母エキス 0.1% , 寒天 15 g/L , pH 7.3)斜面に移植し、 $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ で2日間培養した。

単離したコロニー中にシュードモナス属に属す



5,7,4'-トリヒドロ
キシイソフラボン
(ゲニステイン)

(実施例)

つぎに、本発明をさらに説明するため、実施例を掲記するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

実施例 1.

(1) 土壤より、ゲニステイン生産菌株の分離
ゲニステインはシュードモナス属に属するゲニステイン生産菌を培地に培養することにより行われる。シュードモナス属に属するゲニステイン生産菌株は以下に示す希釈平板法を用いて土壤中より分離される。

乾燥重量で約 1 g 当量の土壤を滅菌試験管に取り、滅菌蒸留水を加えて 10 mL とした。次いでこの混合物を試験管振盪器により10秒間混合し、10分間放置した。試験管内容物 0.5 mL

る菌株を見い出すことが出来た。シュードモナス属に属するゲニステイン生産菌中好ましい菌株(YO-0170 J株と称す)が、上記分離法によって土壤試料から新たに単離された。これは前記の菌学的性質を有する。

(2) 酸酵法によるゲニステインの採取

ベネット寒天培地に発育させたシュードモナスエス・ピー YO-0170 J株の菌体を、グルコース 3% 、デキストリン 3% 、SIIIミート 1.5% ファーマメディア 1.5% 、リン酸二カリウム 0.6 g/L 、リン酸一カリウム 0.25 g/L 、塩化コバルト 0.004 g/L を含む培地(500 mL 容の三角フラスコに各々 60 mL の培地を分注して $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20分間滅菌したもの)に接種して $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ で三日間振盪培養し、種培養液とする(消泡剤としてアデカノールを用いた)。

次に、同じ培地成分を同容量含む三角フラスコ850本を用意し、 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20分間滅菌したものに、種培養液より 3% の割合に接種して、 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、4日間220回転/分で振盪培養する。培養終了後、夫々の三角フラスコの培養液を集め合せて、希塩酸水

溶液で pH 2.0 に調整し、3,000 回転 15 分間遠心して菌体を除き、その上清を集めると約 45 l の培養液が得られる。この液に同量の酢酸エチルを加えて攪拌したのち、溶媒層を分離する。この溶媒層に水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7.0 ~ 8.0 に調整した蒸留水の等量を加えて、攪拌したのち溶媒層を分離する。この分離した酢酸エチル層を減圧下に蒸留乾涸すると褐色の粗物質 5.13 g が得られる。この物質はプロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー-75巻、2021 ~ 2024 頁 (1978年) に記載のプロテインキナーゼ酵素阻止法を用いて検定すると、81.3 mcg/ml が 50 % 阻止濃度 (ID_{50}) であった。

この粗物質 5.13 g をシリカゲルクロマトグラフィ (和光純薬製、カラムサイズ 2.5 × 45 cm、担体量 240 ml、溶媒系 クロロホルム : 酢酸エチル = 9 : 1) で 1 フラクション、16 ml で精製分画するとフラクション 16 ~ 100 に有効成分の阻止活性が認められた。この阻止活性の見られたフラクション

を一つにまとめて、減圧下に蒸留乾涸すると約 400 mg の黄褐色の物質が得られ、その ID_{50} 値は 27.6 mcg/ml であった。さらに、この物質を精製するため、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィ (和光純薬製、カラムサイズ 1.1 × 28 cm、担体量 27 ml、溶媒系 トルエン : 酢酸エチル = 19 : 1) にかけ同溶媒系で展開し、1 フラクション 7 ml で分画するとフラクション 26 ~ 138 に阻止活性が認められた。夫々のフラクションを合わせたのち、減圧下に濃縮乾涸すると 144.6 mg の淡黄色の物質が得られ、その ID_{50} 値は 12.2 mcg/ml を示した。この物質を少量のメタノールに溶解し、セルローズ薄層クロマトプレート (メルク社製) に付けて、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) : アセトニトリル : ノルマルブロバノール = 80 : 20 : 2.5 の混合溶媒で展開して、マナスルライト (2536 \AA 、マナスル工業株式会社製) で紫外外部吸収の見られる R_f 値 0.6 附近をかきとり、それにメタノールを加えて有効成分を溶離させた。

セルローズ担体を汎紙で汎過して除いたのち、

汎液を減圧下に濃縮乾涸する。これにメタノールの少量を加えて溶解したのち、トルエンを加えて結晶化させると、白色の結晶 12 mg が得られる。この結晶の物理化学的性質は前述した通りである。また、この結晶のラウス肉腫由来チロシンキナーゼに対する ID_{50} 値は 8.0 mcg/ml であった。